Journal of Horticultural Science
https:// jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 36, No. 1, Spring 2022, p. 57-69

Effect of Hormonal Combination of Auxin and Cytokinin on Micropropagation of Eastern Lily (*Lilium* oriental hybrid 'Casablanca') Plant Using Bulb Scale Explant

N. Javaheri[1], B. Kaviani[2*]

Received: 05-01-2021
Revised: 31-01-2021
Accepted: 17-04-2021
Available Online: 20-06-2022

How to cite this article:
Javaheri N., and Kaviani B. 2022. Effect of Hormonal Combination of Auxin and Cytokinin on Micropropagation of Eastern Lily (*Lilium* oriental hybrid 'Casablanca') Plant Using Bulb Scale Explant. Journal of Horticultural Science, 36(1): 57-69. (In Persian with English abstract)
DOI: 10.22067/JHS.2021.67900.1007

Introduction

Lily, a member of the genus *Lilium*, belonging to the Liliaceae family is one of the most important commercial pot and cut flower species and one of the three major bulb crops in the commercial market because of its large, colorful and fascinating flowers. Lily hybrids are the most economically important plants with varied flowers. Hybrid Eastern lily (*Lilium* oriental hybrid 'Casablanca') is a perennial bulbous plant that its propagation by bulb in natural condition is time-consuming, so produces 1–2 bulblets per bulb scale in one years' time which is not sufficient for large scale cultivation of this plant. One of the most important and best methods for vegetative propagation and breeding of lilies is *in vitro* bulb scale culture. *In vitro* adventitious bud regeneration from scales of *Lilium* rely on many factors like cytokinin and auxin concentrations such as BA and NAA. The successful use of tissue culture techniques for rapid propagation of some species of the genus *Lilium* including *L. ledebourii*, *L. orientalis*, *L. longiflorum*, *L. japonicum*, *L. speciosum*, *L. concolor*, *L. nepalense*, *L. regale*, *L.* oriental hybrid, *L.* Asiatic hybrid has been reported. The purpose of the current study was to evaluate the effect of different concentrations of BA and NAA on *in vitro* proliferation of *Lilium* oriental hybrid 'Casablanca' using bulb scale as explant to establish a suitable protocol.

Materials and Methods

Effect of various concentrations of 6-benzyle adenine (BA; 0, 0.5, 1 and 2 mg l^{-1}) and α-naphtaleneacetic acid (NAA; 0, 0.1, 0.2 and 0.4 mg l^{-1}) were evaluated on *in vitro* proliferation of *L.* 'Oriental'. Bulb scale as explant and MS basal medium as culture medium were used. Activated charcoal was applied to inhibit the browning of the culture medium and explant. The experiments were conducted in completely randomized design (CRD). The 16 treatments were applied, each treatment had 4 replications and each replication had 4 individuals. Therefore, in these experiments, a total of 192 bulbs were used. Traits including total plantlets fresh weight, leaf length, leaf number, bulblet weight, bulblet diameter, bulblet number, survival percentage, root length and root number related to *in vitro* proliferation were measured. All the statistical analyses were done by using SAS and Tukey's test. Arcsin software was used for changing percent data.

Results and Discussion

The interaction effect of BA and NAA was significant for all measured traits. Results showed that the maximum number of bulblet (8.66) and root (5.36) were obtained in culture medium enriched with 0.5 mg l^{-1} BA together with 0.4 mg l^{-1} NAA. Culture media supplemented with 0.5 mg l^{-1} BA together with 0.2 mg l^{-1} NAA and 1 mg l^{-1} BA together with 0.1 mg l^{-1} NAA with induction of 7.33 bulblets per explant were suitable media. The largest number of leaf (4.33) was measured in culture medium containing 1 mg l^{-1} BA together with 0.1 mg l^{-1} NAA. The highest bulblet weight was measured in culture medium supplemented with 1 mg l^{-1} BA

1 and 2- M.Sc. Student and Associate Professor, Department of Horticultural Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: kaviani@iaurasht.ac.ir)

along with 0.2 mg l^{-1} NAA. The greatest survival rate (100%) was observed in medium enriched with 0.5 mg l^{-1} BA together with 0.1 mg l^{-1} NAA. Survival rate (90%) in explants treated with 2 mg l^{-1} BA along with 0.4 mg l^{-1} NAA was high. Obtained results revealed that the presence of both BA and NAA in culture media for enhancement of most traits is necessary and critical. Plantlets were transferred to a growing medium containing cocopeat, peat moss and perlite in identical proportion for acclimatization following proliferation. Approximately, 90% of regenerated plantlets survived and were morphologically similar to the mother stocks. This study will help the producers and breeders for commercial and improvement purposes. The effective role of the simultaneous presence of both auxin and cytokinin in the culture medium in effective organogenesis was shown in the present study. Similar findings were reported for some lilies such as *L. ledebourii* (Baker) Bioss., *L. longiflorum* and *L. regale*. Auxin was effective in stimulating bulb production and growth of the aerial part of the eastern lily, and its presence along with cytokinin is essential for leaf induction. Some studies have reported similar results. The type and optimal concentration of plant growth regulators (PGRs) in the culture medium for suitable *in vitro* propagation varies in different species. Genetic variations (species type), differences in the amount of endogenous production of PGRs and their interaction with each other are among some reasons for this difference. The proper ratio of auxin and cytokinin in the culture medium is effective for inducing cell division, cell differentiation, organogenesis and finally for achieving a complete plant. Root production with appropriate quantity and quality leads to the suitable survival of seedlings resulting from the growth of cultured explants under *in vitro* conditions and adapted plants. Current study showed that the presence of both BA and NAA is better than the presence of one of these two PGRs for induction and growth of root. Some similar findings were reported, however in most studies, the presence of auxin as individual PGR has been found to be more suitable for root induction.

Keywords: Bulbous plants, Liliaceae, Plant growth regulators, Tissue culture

نشریه علوم باغبانی
https:// jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۶، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱، ص ۶۹-۵۷

اثر ترکیب هورمونی اکسین و سیتوکینین بر ریزازدیادی گیاه سوسن شرقی (*Lilium* oriental hybrid 'Casablanca') با استفاده از ریزنمونه‌ی فلس پیاز

نیما جواهری[۱]- بهزاد کاویانی[۲]*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۸

چکیده

تکثیر سوسن شرقی دورگ (*Lilium* oriental hybrid 'Casablanca')، به عنوان یک گیاه پیازدار چند ساله از خانواده‌ی لیلیوم (Liliaceae) در شرایط درون‌شیشه‌ای به دلیل فرآیند زمانبر تکثیر به روش طبیعی آن با استفاده از پیاز از اهمیت زیادی برخوردار است. از فنون کشت درون‌شیشه‌ای به دلیل باززایی سریع مواد گیاهی و تولید انبوه و یکنواخت گیاهان، در برنامه‌های اصلاحی و تولید تجاری سوسن‌ها استفاده می‌شود. در این تحقیق به منظور افزایش سرعت تکثیر، اثر غلظت‌های مختلف ۶-بنزیل آدنین (BA؛ صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و α-نفتالن استیک اسید (NAA؛ صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) بر تکثیر درون‌شیشه‌ای سوسن شرقی دورگ کازابلانکا ارزیابی شد. فلس پیاز به عنوان ریزنمونه، محیط پایه‌ی MS به عنوان محیط کشت و زغال فعال به عنوان جاذب ترکیبات فنلی به منظور ممانعت از قهوه‌ای شدن محیط کشت و ریزنمونه استفاده شدند. بعد از ۹۰ روز کشت، برخی صفات مرتبط با تکثیر درون‌شیشه‌ای از جمله رشد و نمو پیازچه‌ها، برگچه‌ها و ریشه‌ها اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان دادند که بیشترین تعداد پیازچه (۸/۶۶) و ریشه (۵/۳۶) در محیط کشت غنی‌شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و بیشترین تعداد برگ (۴/۳۳) در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA تولید شدند. بعد از تکثیر، گیاهچه‌ها برای سازگاری به بستری از کوکوپیت، پیت‌ماس و پرلیت به نسبت مساوی منتقل شدند که حدود ۹۰ درصد از گیاهچه‌های باززایی‌شده بقا داشتند و از نظر ریخت‌شناسی شبیه پایه‌های مادری بودند. بر اساس نتایج حاصل از پژوهش، حضور هر دو تنظیم‌کننده‌ی رشد اکسین NAA و سیتوکینین BA برای ریزازدیادی بهینه (تولید پیازچه، برگچه و ریشه) بهینه‌ی سوسن شرقی دورگ کازابلانکا لازم است.

واژه‌های کلیدی: زغال فعال، رشد پیازچه، سوسنیان، گیاهان زینتی، کشت درون‌شیشه‌ای

مقدمه

سوسن شرقی (*Lilium* oriental) از خانواده‌ی سوسنیان (Liliaceae)، یک گونه‌ی زینتی گلدانی و شاخه‌بریده است (Youssef *et al*., 2019). جنس سوسن دارای ۱۰۰ تا ۱۱۵ گونه با تنوعی از شکل، رنگ و اندازه‌ی گل است که این ویژگی‌ها آنرا به عنوان یکی از مهم‌ترین جنس‌های گیاهان گلدانی و شاخه‌بریده با اهمیت تجاری بالا مطرح کرده است (Robinson and Firoozabady, 1993; Youssef *et al*., 2019). دورگ‌های این گیاهان نیز با داشتن گل‌های متنوع یکی از مهم‌ترین گروه‌های تجاری گیاهان پیازی هستند (Roh, 2011; Younis *et al*., 2014). سرعت تکثیر رویشی سوسن در طبیعت که عمدتاً از طریق فلس‌های پیاز و ساقه انجام می‌شود، بسیار پایین است. با توجه به اینکه یکی از اهداف محققان و تکثیرکنندگان معرفی ارقام جدید سوسن به بازار است، بنابراین، این فرآیند نیز به کندی انجام می‌شود (Langens-Gerrits and De Klerk, 1999; Wu *et al*., 2019). به همین جهت، استفاده از فنون کشت درون‌شیشه‌ای با تولید انبوه و باززایی سریع مواد گیاهی یکنواخت و یک‌شکل به منظور اصلاح و کاربرد

۱ و ۲- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه باغبانی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
(*- نویسنده مسئول: (Email: kaviani@iaurasht.ac.ir
DOI: 10.22067/JHS.2021.67900.1007

تجاری سوسن‌ها ضروری است (Muhammad Pelkonen, 2005 ; *et al.*, 2013). کشت درون‌شیشه‌ای، یک ابزار ممتاز و یک فناوری پیشرفته‌ی تکثیر سریع رویشی برای تولید تعداد زیادی گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زا در یک بازه‌ی زمانی کوتاه در یک فضای محدود است، که همچنین می‌تواند به حفظ گونه‌های در معرض خطر انقراض و ذخیره و تبادل ژرم‌پلاسم نیز کمک نماید (Kaviani, 2020). در کشت درون شیشه‌ای سوسن‌ها، استفاده از پیازچه به دلیل انجام راحت‌تر مراحل کار، قوی‌تر بودن و ضد عفونی مطمئن‌تر نسبت به استفاده از برگچه‌ها ارجحیت دارد (Wu *et al.*, 2019). در طی سازگاری گیاهچه‌های تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای با شرایط برون‌شیشه‌ای، هر چه پیازچه‌های تولیدی در شرایط درون‌شیشه‌ای بزرگ‌تر باشند، گیاهچه‌ها سازگاری بهتری در شرایط برون‌شیشه‌ای خواهند داشت، برگچه‌ها رشد بیشتری می‌کنند و ورود به مرحله‌ی گلدهی سریع‌تر اتفاق می‌افتد (Langens-Gerrits *et al.*, 2003 ; Lian *et al.*, 2003a; Wu *et al.*, 2019). بنابراین، بقای گیاهچه‌ها بیشتر تضمین می‌شود و مرحله‌ی اصلاحی با سرعت بیشتری طی می‌گردد (Wu *et al.*, 2019Podwyszyńska, 2012 ;).

کاربرد موفقیت‌آمیز فنون کشت بافت برای تکثیر سریع برخی گونه‌های جنس سوسن (*Lilium*) از جمله *L. longiflorum* (Nhut *et al.*, 2002; Bacchetta *et al.*, 2003; *et al.*, 2001 ; Nhut, 2003; Han *et al.*, 2004)، *L. speciosum* (Chang et al., 2000)، *L. nepalense* (Wawrosch *et al.*, 2001)، *L.* Oriental و *L.* Asiatic دورگ (Lian *et* Lian *et al.*, 2002a ; *al.*, 2003; Han *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2008; Taha *et al.*, 2018) و *L. ledebourii* (Azadi and Khush-khui, 2007)، *L. orientalis* cv. (Kumar *et al.*, 2006)، *Lilium* sp. Starfighter (Youssef *et al.*, 2019) گزارش شده است. یکی از مناسب‌ترین و پرکاربردترین روش تکثیر رویشی سوسن، کشت فلس پیاز در شرایط درون‌شیشه‌ای است (Bahr and Compton, 2004 ; Han *et al.*, 2004; Azadi and Khush-khui, 2007; Youssef *et al.*, 2019). باززایی جوانه‌ی نابجا از فلس‌های سوسن به عوامل مانند نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به ویژه اکسین و سیتوکینین و موقعیت فلس یا نوع ریزنمونه بستگی دارد (Paek and Murthy, 2002; Azadi and Khush-khui, 2007;). از غلظت‌های مختلف NAA و BA در ترکیب با یکدیگر برای تکثیر درون‌شیشه‌ای برخی گونه‌ها و ارقام سوسن استفاده شده است (Azadi and Khush-khui, 2007; Joshi and Dhar, 2009; Mir *et al.*, 2012; Youssef *et al.*, 2019). سایر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نیز برای اندام‌زایی مستقیم و غیر مستقیم به کار گرفته شدند (Robinson and Firoozabady, 1993; Han *et al.*, 2004). در سوسن چلچراغ (*L. ledebourii* (Baker) Bioss.)، بیشترین تعداد پیازچه و بالاترین درصد ریشه‌زایی با کشت فلس پیاز روی محیط کشت غنی‌شده با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (Azadi and Khush-khui, 2007). مطالعه روی رقم 'Casablanca' سوسن شرقی نشان داد که ریزنمونه‌ی فلس پیاز در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین تعداد برگچه را تولید کرد. همچنین با استفاده از قطعات کوچک برگچه به عنوان ریزنمونه و کشت در محیط حاوی هر دو تنظیم کننده‌ی رشد BA و IAA همراه با زغال فعال، بیشترین تعداد شاخه تولید شد (Han *et al.*, 2004). کشت فلس پیاز در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر BA در *L. longiflorum* (Mir *et al.*, 2012) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در 'Geogia' *L. longiflorum* (Han et al., 2004) منجر به تولید بالاترین درصد پیازچه و شاخه شد. کارایی NAA و BA در رشد و نمو پیازچه، برگچه و ریشه در سه گونه‌ی سوسن (*concolor*، *amabile* و *callosum*) متغیر بود (Jeong, 1996). غلظت‌های بیشتر از یک میلی‌گرم در لیتر NAA با یا بدون BA از رشد پیازچه، برگچه و ریشه ممانعت به عمل آوردند، در حالی که استفاده از غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به تنهایی یا در ترکیب با غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA باعث افزایش رشد و تعداد در این اندام‌ها شد. در گونه‌های *amabile* و *callosum* استفاده از غلظت‌های یک تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA موجب تولید کالوس گردید (Jeong, 1996). رشد بهتر پیازچه در محیط کشت حاوی زغال فعال در برخی ارقام سوسن شرقی از جمله رقم 'Casablanca' گزارش شد (Han *et al.*, 2004).

در بررسی منابع مشخص گردید که برای ریزازدیادی موفق گونه‌ها و ارقام مختلف سوسن، اغلب از فلس پیاز به عنوان ریزنمونه و از NAA و BA به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی و سیتوکینینی استفاده شده است. مطالعه روی ریزازدیادی سوسن شرقی بسیار اندک انجام شده است. بنابراین، هدف از انجام این پژوهش، اثر غلظت‌های مختلف NAA و BA روی تکثیر درون شیشه‌ای سوسن شرقی دورگ (*Lilium* oriental hybrid 'Casablanca') و افزایش سرعت آن به روش اندام‌زایی مستقیم با استفاده از ریزنمونه‌ی فلس پیاز بود. استفاده از نوع، غلظت و ترکیب بهینه‌ی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، روند رشد و نمو و تکثیر این گیاه را تسریع می‌کند، بر میزان بقای گیاهچه‌ها بعد از انتقال برون شیشه‌ای و در طی مرحله‌ی سازگاری می‌افزاید و احتمال اصلاح را افزایش می‌دهد.

مواد و روش‌ها

شرایط آزمایش، ریزنمونه و ضدعفونی آن‌ها

این تحقیق طی سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۹۸ در موسسه‌ی تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم کشاورزی هیرکان (شرکت هیرکان فناور آزما) واقع در شهر آمل استان مازندران به مرحله‌ی اجرا در آمد. پیاز سوسن شرقی دورگ (*Lilium* oriental hybrid 'Casablanca')، به عنوان نمونه‌های گیاهی از بازار گل تهران خریداری شد. فلس‌های آسیب‌دیده و آلوده حذف و فلس‌های سالم از طبق جدا شدند و به عنوان منبع ریزنمونه ضد عفونی شدند. فلس‌ها پس از ضد عفونی و قبل از استفاده و قرارگیری در محیط کشت، به دو نیمه‌ی مساوی به ابعاد ۷ در ۷ میلی‌متر برش زده شدند. ضد عفونی نمونه‌ها با استفاده از قارچ‌کش، اتانول، هیپوکلریت سدیم و کلرید جیوه انجام شد. در ابتدا، نمونه‌های گیاهی به مدت یک ساعت در زیر جریان روان آب شهری همراه با چند قطره مایع ظرفشویی به‌خوبی شسته شدند و سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول قارچ‌کش رورال تی‌اس (متالاکسیل) قرار داده شدند، و بعد از آن با آب مقطر شستشو گردیدند. از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه استفاده شد و ۳ بار شستشوی کامل با آب مقطر استریل در زیر هود انجام گرفت. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم (با یک درصد کلراید قابل دسترس) قرار داده شدند و سپس ۳ بار با آب مقطر استریل مورد شستشو قرار گرفتند و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۱ درصد کلرید جیوه غوطه‌ور گردیدند و پس از آبکشی کامل با آب مقطر استریل مورد استفاده قرار گرفتند.

محیط کشت، تیمارها و شرایط نگهداری ریزنمونه‌ها

محیط کشت مورد استفاده، محیط پایه‌ی MS (Murashige and Skoog, 1962) بود که مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از آن درون هر ارلن حاوی تیمارهای هورمونی توزیع گردید. تیمارهای هورمونی، غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA (۱۶ تیمار) بودند که به صورت انفرادی و یا در ترکیب با یکدیگر استفاده شدند. برای هر تیمار، ۴ تکرار (۴ شیشه‌ی مربا) در نظر گرفته شد و هر تکرار شامل ۴ مشاهده (۴ ریزنمونه در هر شیشه) بود. از آنجایی که شیشه‌ی مربا و ظرف دربدار پلاستیکی مدرج نیستند، برای برداشت مقادیر یکسان و دقیق از محیط‌های کشت، آن‌ها ابتدا در استوانه‌ی مدرج ریخته شدند سپس در شیشه‌های مربا و ظروف دربدار پلاستیکی توزیع گردیدند. اسیدیته (pH) محیط کشت قبل از اتوکلاو، برابر با ۵/۸-۵/۶، آگار ۰/۸ درصد و ساکارز ۳ درصد بود. از غلظت ۰/۳ درصد زغال فعال برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها استفاده شد. محیط‌های کشت همچنین حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر مایواینوزیتول، ۵ میلی‌گرم در لیتر نیاسین، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر پیریدوکسین، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تیامین، ۲ میلی‌گرم در لیتر گلایسین و ۱ گرم در لیتر کازیین هیدرولیزات بودند. محیط‌های کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۳۰ دقیقه ضدعفونی شدند. محیط‌های کشت حاوی ریزنمونه‌ها در اتاق رشد تحت فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۱ ± ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۸۰-۷۵ درصد و جریان تراکم فتون فتوسنتزی ۵۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه نگهداری گردیدند.

صفات اندازه‌گیری شده و شرایط سازگاری گیاهچه‌ها

بعد از گذشت حدود ۹۰ روز از کشت، وزن کل گیاهچه، طول برگ، تعداد برگ، وزن پیازچه، قطر پیازچه، تعداد پیازچه، درصد زنده‌مانی پیازچه، طول ریشه و تعداد ریشه اندازه‌گیری شدند. در طی این ۹۰ روز، چهار بار واکشت به ترتیب با فواصل ۲۰، ۲۰، ۲۵ و ۲۵ روز انجام شد. ظروف اولیه برای کشت فلس‌های پیاز، شیشه‌های مربا بودند و واکشت نمونه‌های گیاهی در ظروف دربدار پلاستیکی انجام شد. اندازه‌گیری صفات وزنی اندام‌ها با ترازوی دیجیتال و صفات طولی اندام‌ها با خط‌کش انجام شد و تعداد اندام‌ها با چشم غیرمسلح شمارش گردید. گیاهچه‌های بالغ با آب مقطر استریل شسته شده و به گلدان‌های پلاستیکی حاوی پیت‌ماس، کوکوپیت و پرلیت به نسبت مساوی منتقل گردیدند. گلدان‌ها در یک گلخانه با دمای ۲۶-۲۴ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۵ درصد و نور ۵۰۰۰ لوکس با آبیاری منظم به مدت یک ماه نگهداری شدند تا مرحله‌ی سازگاری انجام شود.

طرح آماری و تجزیه‌ی داده‌ها

طرح آزمایشی مورد استفاده؛ فاکتوریل (فاکتور اول، تنظیم‌کننده رشد BA و فاکتور دوم، تنظیم‌کننده رشد NAA) در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) با چهار تکرار بود. تجزیه‌ی داده‌ها به کمک نرم‌افزار SAS (شماره‌ی ۹/۴) و مقایسه میانگین‌ها با روش توکی در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. از Arcsin برای تبدیل داده‌های درصدی استفاده شد. کرت‌ها، ظروف دربدار پلاستیکی حاوی ریزنمونه‌ها بودند. مشاهده هر ۲ هفته یک‌بار انجام شد.

نتایج

وزن گیاهچه و رشد و نمو برگ

تفاوت‌های وزن تر کل گیاهچه در ریزنمونه‌های رشد یافته تحت غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی NAA و BA معنی‌دار بود (جدول ۱). کمترین وزن تر کل گیاهچه (۱/۶۰ گرم) در سوسن شرقی در ریزنمونه‌های شاهد به‌دست آمد و بیشترین وزن کل گیاهچه (۵/۸۴ گرم) در ریزنمونه‌های تیمارشده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (جدول ۲). وزن کل گیاهچه (۴/۷۰ گرم) در ریزنمونه‌های تیمار شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA نیز بالا بود و در رتبه‌ی دوم قرار داشت. اهمیت حفظ توازن هورمونی برای ارتقای این صفت در نتیجه‌ی حاصل مشخص شد. ارتباط مستقیمی بین افزایش وزن کل گیاهچه و افزایش غلظت BA و NAA وجود نداشت (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان‌دهنده‌ی وجود اثرات متقابل معنی‌دار غلظت‌های مختلف NAA و BA بر طول برگ در سطح احتمال ۱ درصد ($p \leq 0/01$) بود. بعد از حدود ۵۰ روز که از شروع کشت ریزنمونه گذشت، برگ‌ها در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA تشکیل شدند. تیمار حاوی غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA بالاترین طول برگ (به ترتیب با ۴/۹۰ و ۴/۷۰ سانتی‌متر) را در مقایسه با تیمار شاهد با پایین‌ترین طول برگ (۲/۴۰ سانتی‌متر) القا کرد (جدول ۲ و شکل ۱). جدول ۲ مشخص می کند که عدم حضور یکی از این تنظیم‌کننده‌های رشد، اغلب باعث رشد کمتر برگ‌ها شده است. جداول تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌های حاصل از اثر ساده و متقابل NAA و BA بر تعداد برگ نشان از تفاوت‌های معنی‌دار بین تیمار و پاسخ دارد. بیشترین تعداد برگ (۴/۳۳ عدد در گیاه)، در محیط کشت غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و کمترین تعداد آن (۲/۲۳ عدد در گیاه) در محیط کشت غنی‌شده با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون حضور BA به دست آمد (جدول ۲). این نتیجه نشان از نقش مؤثر BA در غلظت مناسب در تحریک تولید برگ دارد. غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA زمانی نقش مؤثری در القای تولید برگ دارند که با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه شوند (جدول ۲، شکل ۱).

رشد و نمو پیازچه

بعد از حدود ۸۰ روز که از شروع کشت ریزنمونه گذشت، برگ‌ها در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA تشکیل شدند. بالاترین وزن پیازچه (۳/۳۶ گرم) در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. این وزن بیش از ۳ برابر وزن پیازچه‌های تولیدشده در تیمار شاهد بود. نتایج نشان داد که تیمارهای حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA بدون BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بدون NAA همانند تیمار شاهد پیازچه‌های سبک‌وزنی را تولید کردند (جدول ۲). این نتیجه، اهمیت همکاری این دو تنظیم‌کننده‌ی رشد با یکدیگر در غلظت‌های مناسب برای افزایش وزن پیازچه را نشان می‌دهد. جدول ۱ نشان می‌دهد که اثر ساده و اثر متقابل NAA و BA بر وزن پیازچه در سطح احتمال ۱ درصد ($p \leq 0/01$) معنی‌دار است. بیشترین قطر پیازچه (۱/۵۰ سانتی‌متر)، در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد (جدول ۲). این قطر بیش از ۴ برابر قطر (۰/۳۶ سانتی‌متر) پیازچه‌های تولید شده در تیمار شاهد بود. تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی و سیتوکینینی در ترکیب مناسب با یکدیگر و با تحریک تقسیم و طویل شدن سلولی باعث افزایش اندازه‌ی پیازها می‌شوند. جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر ساده و اثر متقابل NAA و BA بر قطر پیازچه در سطح احتمال ۱ درصد ($p \leq 0/01$) معنی‌دار است. اثر ساده‌ی NAA روی تغییر تعداد پیازچه معنی‌دار نبود. از طرف دیگر، اثر ساده‌ی BA در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل NAA و BA در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است (جدول ۱). بیشترین تعداد پیازچه (۸/۶۶) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. این تعداد حدود ۳ برابر تعداد پیازچه‌های تولید شده در تیمار شاهد بود (جدول ۲، شکل ۱). ترکیب ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA در محیط کشت باعث تولید بیش از ۷ پیازچه شد. درصد بقا یا زنده‌مانی پیازچه‌ها طی ریزازدیادی، در تیمار حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بالاترین بود. در این تیمار، ۱۰۰ درصد پیازچه‌ها زنده ماندند (جدول ۲). کمترین بقای پیازچه‌ها (۶۶/۳۳ درصد) در محیط کشت شاهد به دست آمد. استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA، باعث زنده‌مانی ۹۰ درصد از پیازچه‌ها شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان‌دهنده‌ی وجود اثرات متقابل معنی‌دار غلظت‌های مختلف NAA و BA در سطح احتمال ۵ درصد ($p \leq 0/05$) و غلظت‌های مختلف BA بر درصد بقای پیازچه‌ها در سطح احتمال ۱ درصد ($p \leq 0/01$) بود.

رشد و نمو ریشه

جدول ۱ نشان می‌دهد که اثر متقابل NAA و BA بر طول ریشه در سطح احتمال ۵ درصد (p≤۰/۰۵) معنی‌دار است. همچنین اثر هر یک از این دو تنظیم کننده‌ی رشد گیاهی به تنهایی بر طول ریشه در سطح احتمال ۱ درصد (p≤۰/۰۱) معنی‌دار است. حدود ۳۵ روز بعد از شروع کشت ریزنمونه، ریشه‌ها در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA تشکیل شدند. جدول ۲ نشان می‌دهد که بیشترین طول ریشه (۶/۷۶ سانتی‌متر) مربوط به گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA است. طول ریشه (۵/۲۶ سانتی‌متر در گیاه) در گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت غنی‌شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA نیز مناسب تشخیص داده شد. در هر دوی این تیمارها، غلظت BA برابر با ۱ میلی‌گرم در لیتر بود. از طرف دیگر، کمترین طول ریشه (۱/۴۳ سانتی‌متر) در گیاهچه‌های رشد یافته در محیط کشت بدون BA و NAA مشاهده شد. این یافته نقش همکاری BA و NAA را در تحریک مؤثر رشد ریشه نشان داد. هیچ ارتباط مستقیمی بین افزایش یا کاهش غلظت هر دو تنظیم کننده‌ی رشد در محیط کشت با افزایش یا کاهش رشد ریشه مشاهده نشد (جدول ۲، شکل ۱). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر متقابل NAA و BA بر تعداد ریشه در سطح احتمال ۵ درصد (p≤۰/۰۵) معنی‌دار بود. BA به تنهایی اثر معنی‌داری روی تغییر تعداد ریشه نداشت و اثر NAA به تنهایی روی تغییر تعداد ریشه در سطح احتمال ۱ درصد (p≤۰/۰۱) معنی‌دار بود. جدول مقایسه میانگین صفات (جدول ۲) نشان داد که بیشترین تعداد ریشه (۵/۳۶) در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در ترکیب با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و کمترین تعداد آن (۱/۹۰) در تیمار شاهد شمارش شد. تولید تعداد کم ریشه در محیط فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد، حاکی از ضرورت حضور حداقل یکی از این دو تنظیم‌کننده در محیط کشت برای تحریک تولید ریشه است. نتایج نشان داد که تعداد ریشه‌ها در همه تیمارهای فاقد NAA کم بود (جدول ۲، شکل ۱). گیاهان باززایی‌شده طی سازگاری در گلخانه و کاشته‌شده در بسترهای حاوی پیت‌ماس، کوکوپیت و پرلیت به نسبت مساوی از نظر ریخت‌شناسی مشابه با گیاهان مادری بودند و علائمی از تغییر فنوتیپی قابل مشاهده را نشان ندادند. حدود ۹۰ درصد از گیاهان سازگارشده در شرایط برون شیشه‌ای، زنده ماندند.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BA و NAA بر برخی صفات سوسن شرقی دورگ (*Lilium* oriental hybrid 'Casablanca') در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 1- ANOVA for the effect of different concentrations of BA and NAA on some traits of eastern lily hybrid (*Lilium* oriental hybrid 'Casablanca') in *in vitro* condition

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	تعداد ریشه Root number	طول ریشه Root length	درصد زنده‌مانی Survival percentage	تعداد پیازچه Bulblet number	قطر پیازچه Bulblet diameter	وزن پیازچه Bulblet weight	تعداد برگ Leaf number	طول برگ Leaf length	وزن تر کل گیاهچه Total fresh weight of plantlet
تکرار Replicate	2	0.0308ns	0.181ns	100ns	0.333ns	0.0202ns	0.0327ns	0.0208ns	0.316ns	0.0098ns
۶-بنزیل آدنین BA	3	0.276ns	2.34**	483**	13.72**	0.173**	1.926**	2.25**	4.29**	5.807**
α-نفتالن استیک اسید NAA	3	8.559**	21.85**	188ns	3.38ns	0.265**	2.337**	0.527*	1.002**	3.65**
BA × NAA	9	0.744*	1.43*	209*	6.37*	0.226**	0.536*	0.546*	0.684**	1.371*
خطا Error	39	0.405	0.501	80.01	2.77	0.032	0.191	0.2208	0.197	0.458
ضریب تغییرات CV (%)	-	19.21	19.3	11.54	31.2	25.8	26.9	15.40	13.70	17.80

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، * معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، ns عدم معنی‌داری

** and *: significant at 1 and 5% of probability level, respectively; ns: No-significant

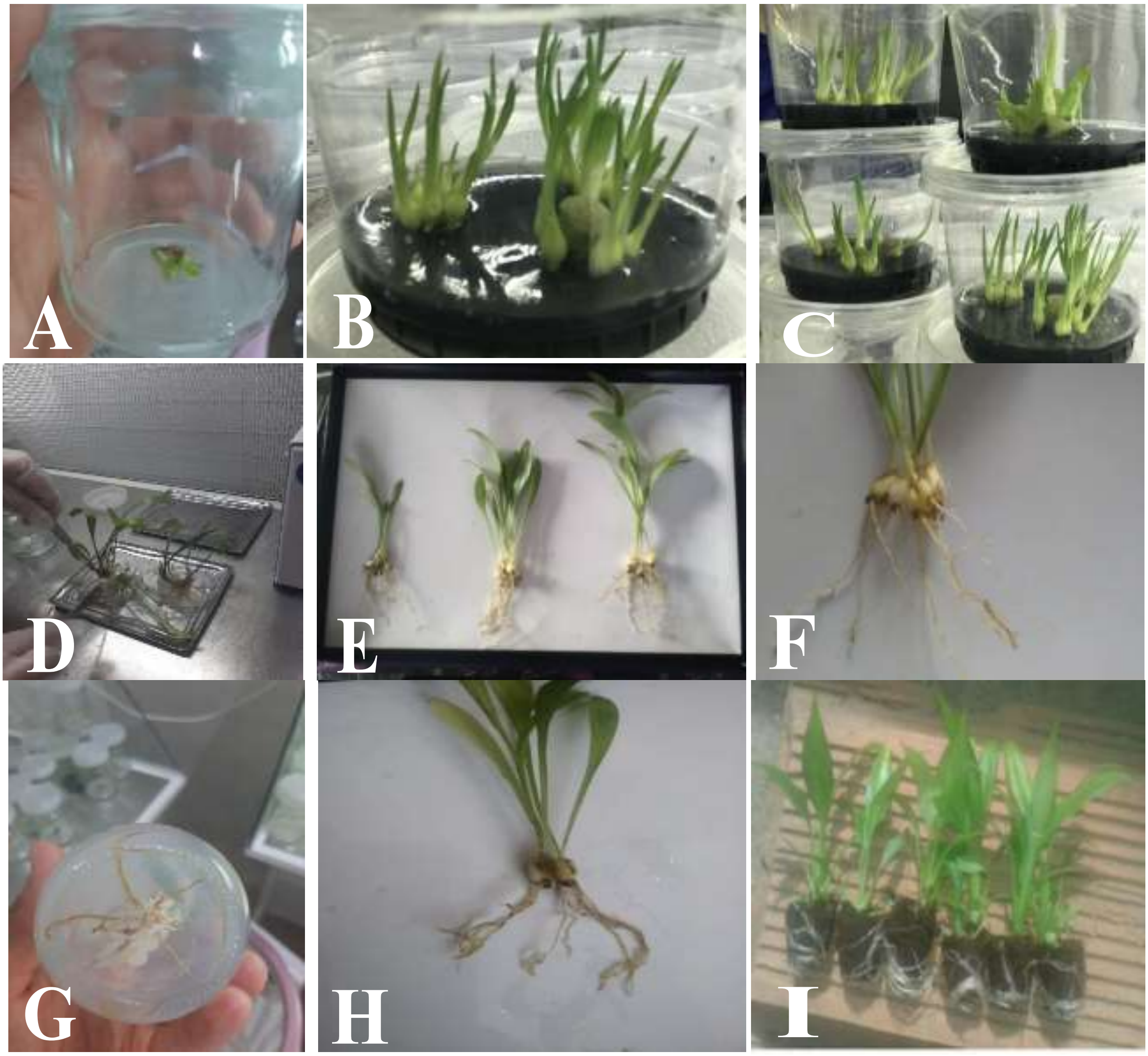
جدول ۲- اثر متقابل غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی BA × NAA روی برخی صفات سوسن شرقی دورگ (*Lilium* oriental hybrid 'Casablanca') در شرایط درون‌شیشه‌ای

Table 2- The interaction effect of different concentrations of BA ×NAA on some traits of eastern lily hybrid (*Lilium* oriental hybrid 'Casablanca') in *in vitro* condition

٦- بنزیل آدنین BA (mg l^{-1})	α-نفتالن استیک اسید NAA (mg l^{-1})	تعداد ریشه Root number	طول ریشه Root length (cm)	درصد زنده‌مانی Survival percentage	تعداد پیازچه Bulblet number	قطر پیازچه Bulblet diameter (cm)	وزن پیازچه Bulblet weight (g)	تعداد برگ	طول برگ Leaf length (cm)	وزن تر کل گیاهچه Total fresh weight of plantlet (g)
0	0	1.90g	1.43d	63.33e	4.00c-e	0.36e	0.90e	3.00b-d	2.40de	1.60e
0	0.1	3.10c-f	3.70c	70.00c-e	4.33c-e	0.43de	1.30de	2.66cd	2.63c-e	2.86d
0	0.2	3.76b-d	3.73c	70.00c-e	4.66b-e	0.70cd	1.66b-d	3.00b-d	2.66c-e	3.21cd
0	0.4	3.63 b-d	4.60bc	83.33bc	3.33de	0.70cd	0.83e	2.23d	3.73b-d	3.73b-d
0.5	0	2.30e-g	1.80d	83.33bc	5.00b-e	0.66cde	0.80e	2.66cd	3.26bc	2.82d
0.5	0.1	3.23b-e	3.60c	100.00a	4.66b-e	0.80bc	1.70b-d	3.00b-d	3.06b-e	4.38b
0.5	0.2	3.06d-f	4.10bc	73.33c-e	7.33ab	1.06b	2.16bc	3.00b-d	4.90a	3.94b-d
0.5	0.4	5.36a	4.00c	80.0b-d	8.66a	0.66cde	1.70b-d	3.33bc	4.70a	3.62b-d
1	0	2.06fg	1.66d	70.00c-e	5.66b-e	0.56cde	1.66b-d	3.00b-d	2.93b-e	3.63b-d
1	0.1	3.23b-e	3.50c	76.66c-e	7.33ab	1.50a	1.30de	4.33a	3.60b	3.63b-d
1	0.2	3.66b-d	5.26b	76.66c-e	4.33c-e	0.60cde	3.36a	3.66ab	3.50b	5.84a
1	0.4	4.20b	6.76a	66.66de	6.66a-c	0.50cde	2.26b	3.66ab	3.26bc	4.66b
2	0	2.90d-g	2.30d	83.3bc	6.00a-d	0.43de	1.43de	2.34d	2.93b-e	4.03bc
2	0.1	3.03d-f	3.80c	80.00bcd	3.00e	0.70cd	1.46c-e	2.33d	3.03b-e	4.70b
2	0.2	3.43b-d	3.63c	73.33c-e	4.66b-e	0.66cde	1.73b-d	3.33bc	3.20b-d	4.36b
2	0.4	4.13bc	4.53bc	90.00ab	5.66b-e	0.80bc	1.66b-d	3.00b-d	3.00b-e	3.58b-d

حروف مشترک در هر ستون، عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون توکی را نشان می‌دهد.

Means followed by the same letter within each column shows no significant differences at 5% of probability level using Tukey's test.



شکل ۱- مراحل ریزازدیادی در شرایط درون‌شیشه‌ای سوسن شرقی دورگ (*Lilium* oriental hybrid 'Casablanca'). A) ریزنمونه‌ی فلس پیاز کشت شده در محیط حاوی BA و NAA برای تشکیل پیازچه؛ B) تشکیل و رشد پیازچه‌ها در محیط کشت دارای زغال فعال و غنی شده با BA و NAA ؛ C) اثر غلظت‌های مختلف BA و NAA روی رشد و تکثیر پیازچه‌ها، ردیف بالا، سمت چپ: محیط غنی شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، ردیف بالا، سمت راست: محیط حاوی ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA، ردیف پایین، سمت چپ: محیط غنی شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ردیف پایین، سمت راست: محیط غنی شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA که بیشترین تعداد پیازچه را تحریک کرده است؛ D) مرحله‌ی تکثیر با جداکردن گیاهچه‌های حاصل از رشد پیازچه‌ها؛ E) اثر غلظت‌های مختلف BA و NAA روی تعداد برگ و تعداد ریشه، چپ) شاهد، وسط) برگ‌ها و ریشه‌های تولید شده در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و راست) برگ‌ها و ریشه‌های تولید شده در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ F) پیازچه‌های تولید شده در محیط غنی شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ G) تعداد ریشه‌های تولید شده در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA؛ H) گیاهچه‌ی آماده برای سازگاری؛ و I) گیاهچه‌های سازگار شده در گلدان‌های حاوی پیت ماس، کوکوپیت و پرلیت به نسبت مساوی.

Figure 1- Micropropagtion process in *in vitro* condition of eastern lily hybrid (*Lilium* oriental hybrid 'Casablanca'). A) Bulb scale explant cultured in medium containing BA and NAA for bulblet formation; B) formation and growth of bulblets in culture medium with activated charcoal and enriched with BA and NAA; C) effect of different concentrations of BA and NAA on growth and proliferation of bulblets. Up row, left: medium enriched by 0.5 mg.l^{-1} BA together with 0.2 mg.l^{-1} NAA, up row, right: medium containing 0.4 mg.l^{-1} NAA, down row, left: medium enriched by 1 mg l^{-1} BA together with 0.1 mg.l^{-1} NAA, Down row, right: medium enriched by 0.5 mg.l^{-1} BA together with 0.4 mg.l^{-1} NAA that has been induced maximum number of bulblet; D) multiplication phase with isolation of plantlets obtained bulblets growth; E) effect of different concentrations of BA and NAA on the number of leaf and root, left: control, middle: leaves and roots produced in medium containing 0.5 mg.l^{-1} BA together with 0.4 mg.l^{-1} NAA; F) Produced bulblets in medium enriched by 1 mg l^{-1} BA together with 0.1 mg l^{-1} NAA; G) root number produced in medium containing 1 mg.l^{-1} BA together with 0.1 mg.l^{-1} NAA; H) plantlet ready for acclimatization; and I) Acclimatized plantlets in pots containing peat moss, cocopeat and perlite in identical ratio

بحث

پژوهش‌های کاربردی به ویژه در شرایط درون‌شیشه‌ای باید به سمت بهینه‌سازی سرعت تکثیر، افزایش کمیت و کیفیت گیاهان تولیدی و معرفی گونه‌ها و ارقام جدید سوق داده شود. استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در انواع و غلظت‌های مناسب و به‌کارگیری ریزنمونه‌های کارآمد با بازدهی بالا از مهم‌ترین عوامل مؤثر در جهت مرتفع کردن این چالش‌ها هستند. نقش مؤثر حضور همزمان هر دوی اکسین و سیتوکینین در محیط کشت، در اندامزایی بهینه در مطالعه‌ی حاضر نشان داده شد. اکسین در تحریک تولید پیازچه و رشد بخش هوایی سوسن شرقی دورگ کازابلانکا مؤثر بود و حضور آن در کنار سیتوکینین برای القای برگ ضروری است. برخی پژوهش‌ها نتایج کاملاً مشابهی را گزارش کرده‌اند (Paek and Murthy, 2002; Azadi and Khush-khui, 2007; Youssef *et al.*, 2019). شرایط مناسب برای به‌دست آوردن تعداد زیادی گیاهچه‌ی سوسن شرقی در شرایط درون‌شیشه‌ای، حضور تنظیم کننده‌های رشد گیاهی است. در *Lilium orientalis* cv. Starfighter، بیشترین تعداد سرشاخه، برگ و فلس پیاز در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (Youssef *et al.*, 2019). بالاترین باززایی پیازچه (۹۴ درصد) و تعداد شاخه (۲۲) در *Lilium longiflorum* در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (Mir *et al.*, 2012). بالاترین باززایی پیازچه (۹۳/۳۰ درصد) و بیشترین تعداد برگ (۳/۸۳) در *Lilium davidii* cv. Unicolor، در محیط کشت تکمیل شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تیدیازورون (TDZ) همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (Ling *et al.*, 2009). مطالعه روی سوسن دورگ *Lilium* oriental 'Casablanca' نشان داد که ریزنمونه‌ی فلس پیاز در محیط کشت حاوی ۲/۲ میکرومولار BA بیشترین تعداد برگچه را تولید کرد (Han *et al.*, 2004). استفاده از قطعات کوچک برگچه به عنوان ریزنمونه و کشت در محیط حاوی هر دوی BA و IAA همراه با زغال فعال باعث تولید بیشترین شاخه شد (Han *et al.*, 2004). همانند نتایج به دست آمده در پژوهش ما، در این تحقیق نیز رشد و زنده‌مانی پیازچه‌ها در گلخانه بالا بود. عموماً، وزن و اندازه‌ی پیازچه دو عامل مهم تأثیرگذار روی بقای گیاهچه‌ها طی سازگاری هستند (Wu *et al.*, 2019). پیازچه‌های بزرگ‌تر تعداد بیشتری برگچه تولید می‌کنند. پیشنهاد شده است که پیازچه‌های سنگین‌تر از یک گرم، رفتار رشدی سریع‌تری نسبت به پیازچه‌های سبک‌تر بعد از کشت کردن در شرایط طبیعی دارند (Langens-Gerrits and De Klerk, 1999). تفاوت در وزن، تعداد و اندازه‌ی پیازچه‌های تولیدی در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای، به نوع، غلظت و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده بستگی دارد (Wu *et al.*, 2016a; Wu *et al.*, 2019).

در پژوهش ما، سنگین‌ترین، قطورترین و بیشترین پیازچه با حضور هر دو تنظیم‌کننده‌ی رشد BA و NAA در محیط کشت تولید شد. نتایج مشابه توسط برخی محققان با مطالعه روی گونه‌ها و ارقام مختلف سوسن گزارش شد. بالاترین درصد تشکیل پیازچه (۸۳/۳۰ درصد) در سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.) روی محیط غنی‌شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد (Azadi and Khush-khui, 2007). بیشترین تعداد پیازچه (۵/۴۱) در سوسن چلچراغ روی محیط غنی‌شده با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد. نتایج مشابه در *Lilium concolor* گزارش شد (Jeong, 1996). افزایش NAA در محیط کشت *Lilium concolor*، تعداد پیازچه‌ها را کاهش داد، در حالی که در پژوهش ما بیشترین تعداد پیازچه در محیط کشت حاوی بالاترین غلظت به کار رفته NAA (۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) تولید شد. مطالعه روی *Lilium oxypetalum*، یک گونه سوسن بومی ارتفاعات هیمالیا، نشان داد که بالاترین باززایی پیازچه‌ها در محیط کشت غنی‌شده با ۲ میکرومولار BA همراه با ۰/۱ میکرومولار NAA به دست آمد (Joshi and Dhar, 2009). درصد زنده‌مانی گیاهچه‌های حاصل از رشد و نمو پیازچه‌ها طی سازگاری در شرایط برون‌شیشه‌ای بعد از ۶ هفته، ۶۶/۷ درصد بود (Joshi and Dhar, 2009). هورمون‌های درون‌زا و برون‌زا، عوامل ژنتیکی، نوع ریزنمونه‌ی مورد استفاده و شرایط محیطی از مهم‌ترین عوامل تعیین کننده‌ی تولید پیازچه و زنده‌مانی آنها هستند و علت تشابهات و تفاوت‌ها را توجیه می‌کنند.

بالاترین درصد ریشه‌زایی (۸۷/۳۰ درصد) در سوسن چلچراغ روی محیط غنی‌شده با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (Azadi and Khush-khui, 2007). بیشترین تعداد ریشه (۲/۸۹) نیز در همین محیط کشت مشاهده شد. در پژوهش حاضر، تولید بیشترین تعداد ریشه با یافته‌های این پژوهش همسو است. همانند نتایج به دست آمده در این پژوهش، عدم حضور هورمون‌های برون‌زا در محیط کشت ریشه‌زایی *Lilium nepalense* باعث عدم افزایش تولید ریشه شد (Wawrosch *et al.*, 2001). در *Lilium longiflorum* افزودن NAA، تعداد ریشه‌ها را نسبت به محیط فاقد هورمون افزایش داد (Nhut, 1998). در *Lilium longiflorum*، بالاترین درصد ریشه‌زایی (۹۳ درصد) و تعداد ریشه (۱۹) در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد (Mir *et al.*, 2012). نوع و غلظت بهینه‌ی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت، برای ریزازدیادی مناسب در گونه‌های مختلف متفاوت است. از دلایل مهم این تفاوت می‌توان به تفاوت ژنتیکی (نوع گونه)، تفاوت در میزان تولید درون‌زای این ترکیبات و اثر متقابل

آنها با یکدیگر اشاره کرد. نسبت مناسب ترکیب هورمونی اکسین و سیتوکینین در محیط کشت، برای القای تقسیم سلولی، تمایز سلولی، اندام‌زایی و در نهایت برای دستیابی به گیاه کامل موثر است. تولید ریشه‌ی با کمیت و کیفیت مناسب، بقای گیاهچه‌های حاصل از رشد ریزنمونه‌های کشت‌شده در شرایط درون‌شیشه‌ای و گیاهان سازگارشده را به دنبال دارد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، حضور هر دو اکسین NAA و سیتوکینین BA برای ریزازدیادی (تولید پیازچه، برگچه و ریشه) بهینه‌ی سوسن شرقی دورگ کازابلانکا (*Lilium* oriental hybrid ‘Casablanca’) لازم است. تولید پیازچه از کشت فلس پیاز می‌تواند با روش اندام‌زایی مستقیم به دست آید. بیشترین تعداد پیازچه و ریشه، همچنین بیشترین تعداد برگ، به ترتیب در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد. تولید انبوه و باززایی سریع گیاهان یکنواخت و یک‌شکل سوسن شرقی به منظور اصلاح و کاربرد تجاری سوسن‌ها ضروری است.

سپاسگزاری

لازم است از مساعدت دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت سپاسگزاری نماییم. همچنین، از موسسه‌ی تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم کشاورزی هیرکان (شرکت هیرکان آزما فناور) آمل و آقای دکتر ناصر نگهدار تشکر می‌کنیم.

منابع

1. Azadi P., and Khush-khui M. 2007. Micropropagation of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments. Electronic Journal of Biotechnology 10(4): 582–591.
2. Bacchetta L., Remotti P.C., Bernardini C., and Saccardo F. 2003. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74(1): 37–44.
3. Bahr L.R., and Compton M.E. 2004. Competence for *in vitro* bulblet regeneration among eight *Lilium* genotypes. Horticulture Science 39: 127–129.
4. Chang C., Chen C.T., Tsai Y.C., and Chang W.C. 2000. A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. var. glorisoides Baker. Botanical Bulletin of Academia Sinica 41(2): 139–142.
5. Han B.H., Suh E.J., Yae B.W., and Yu H.J. 2004. Micropropagation of *Lilium longiflorum* ‘Geogia’ by using bioreactor. Korean Journal of Plant Biotechnology 31(3): 197–201. (In Chinese with English abstract)
6. Han B.H., Yae B.W., Yu H.J., and Peak K.Y. 2004. Improvement of *in vitro* micropropagation of *Lilium* oriental hybrid ‘Casablanca’ by the formation of shoots with abnormally swollen basal plates. Scientia Horticulturae 103(3): 351–359.
7. Jeong J.H. 1996. *In vitro* propagation of bulb scale section of several Korean native lilies. Acta Horticulturae 414: 269–276.
8. Joshi S.K., and Dhar U. 2009. *In vitro* propagation from axenic explants of *Lilium oxypetalum* (D. Don) Baker, an endemic bulbous plant of high altitude Himalaya. Acta Physiologia Plantarum 31: 833.
9. Kaviani B. 2020. *Conservation of ornamental plants in danger of extinction by biotechnological methods*. Publications of Islamic Azad University, Rasht Branch, Iran. p. 187.
10. Kumar S., Chaudhary V., and Kanwar J.K. 2008. *In vitro* propagation of oriental hybrid lily from root explant. Advances in Horticultural Science 22: 63–65.
11. Kumar S., Kanwar J.K., and Sharma D.R. 2006. *In vitro* propagation of *Lilium*. Advances in Horticultural Science 20: 181–188.
12. Langens-Gerrits M.M., and De Klerk G.J.M. 1999. Micropropagation of flower bulbs. Plant Cell Culture Protocols, Springer, New York, pp 141–147.
13. Langens-Gerrits M.M., De Klerk G.J.M., and Croes A. 2003. Phase change in lily bulblets regenerated *in vitro*. Physiologia Plantarum 119: 590–597.
14. Lian M.L., Chakrabarty D., and Paek K.Y. 2002a. Growth and uptake of sucrose and mineral ions by bulblets of *Lilium* oriental hybrid ‘Casablanca’ during bioreactor culture. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 77(3): 253–257.
15. Lian M.L., Chakarabarty D., and Paek K.Y. 2003. Bulblet formation from bulbscale segments of *Lilium* using bioreactor system. Biologia Plantarum 46: 199–202.
16. Lian M.L., Chakarabarty D., and Paek K.Y. 2003a. Growth of *Lilium* oriental hybrid ‘Casablanca’ bulblet using bioreactor culture. Scientia Horticulturae 97: 41–48.
17. Ling S.X., Feng Wang M., and Dong L. 2009. Plant regeneration from *in vitro* cultured leaves of Lanzhou lily

(*Lilium davidii* var. unicolor) Scientia Horticulturae 119: 458–61.

18. Mir J.I., Ahmed N., Itoo H., Sheikh M.A., Rashid R., and Wani S.H. 2012. *In vitro* propagation of Lilium (*Lilium longiflorum*). Indian Journal of Agricultural Sciences 82(5): 455–458.
19. Muhammad N., Ishrat N., Syed M.S.N., and Tariq M. 2013. Standardization of tissue culture conditions and estimation of free scavenging activity in *Viola odorata* L. Pakistan Journal of Botany 45(1): 197–202.
20. Murashige T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473–479.
21. Nhut D.T. 1998. Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via *in vitro* stem node and pseudo-bulblet culture. Plant Cell Reports 17(12): 913–916.
22. Nhut D.T. 2003. The control of *in vitro* direct main stem formation of *Lilium longiflorum* derived from receptacle culture and rapid propagation by using *in vitro* stem nodes. Plant Growth Regulation 40(2): 179–184.
23. Nhut D.T., Huong N.T.D., Le B.V., Da Silva J.T., Fukai S., and Tanaka M. 2002. The changes in shoot regeneration potential of protocorm-like bodies derived from *Lilium Iongiflorum* young stem explants exposed to medium volume, pH, light intensity and sucrose concentration pretreatment. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 77(1): 79–82.
24. Nhut D.T., Le B.V., Fukai S., Tanaka M., and Thanh V.K.T. 2001. Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. Plant Growth Regulation 33 (1): 59–65.
25. Paek K.Y., and Murthy H.N., 2002. High frequency of bulblet regeneration from bulb scale sections of *Fritillaria thunbergii*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68(3): 247–252.
26. Pelkonen V. 2005. Biotechnological approaches in lily (*Lilium*) production. University of Oulu, Oulu. Available from: http://herkules.oulu.fi/isbn9514276590/. ISBN 951-42-7659-0 (PDF). ISSN 0355-3191 http://herkules.oulu.fi/issn03553191.
27. Podwyszyńska M. 2012. The mechanisms of in vitro storage organ formation in ornamental geophytes. Floriculture and Ornamental Biotechnology 6: 9–23.
28. Robinson K.E., and Firoozabady E. 1993. Transformation of floriculture crops. Scientia Horticulturae 55: 83–99.
29. Roh M.S. 2011. Controlled flowering in the genus *Lilium*-review of the past achievements and the future direction of research. Acta Horticulturae 900: 189–203.
30. Taha S.L., Sayed S.S., Farahat M.M., and El-Sayed I.M. 2018. *In vitro* culture and bulblets induction of Asiatic hybrid Lily ‘red alert’. Journal of Biological Science 18: 84–91.
31. Varshney A., Dhawan V., Srivastava P.S. 2000. A protocol for *in vitro* mass propagation of Asiatic hybrids of lily through liquid stationary culture. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 36(5): 383–391.
32. Wawrosch C., Malla P.R., and Kopp B. 2001. Clonal propagation of *Lilium nepalense* D. Don, a threatened medicinal plant of Nepal. Plant Cell Reports 20(4): 285–288.
33. Wu Y., Li Y., Ma Y.D., Zhang L., Ren Z.M., and Xia Y.P. 2016a. Hormone and antioxidant response of *Lilium* Oriental hybrid ‘Sorbonne’ bulblets to humic acid treatments *in vitro*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 92: 1–13.
34. Wu Y., Sun M.Y., Zhang J.P., Zhang L., Ren Z.M., Min R.H., Wang X.Y., Xia Y.P. 2019. Differential effects of paclobutrazol on the bulblet growth of Oriental lily cultured in vitro: growth behavior, carbohydrate metabolism, and antioxidant capacity. Journal of Plant Growth Regulation 38: 359–372.
35. Younis A., Hwang Y.J., and Lim K.B. 2014. Classical vs. modern genetic and breeding approaches for lily (*Lilium*) crop improvement: a review. Flower Research Journal 22: 39–47.
36. Youssef N.M., Shima A., Shaaba, Z.F.G., and Lobna S.T. 2019. *In vitro* bulb formation of direct and indirect regeneration of *Lilium orientalis* cv. “Starfighter” plants. Bulletin of the National Research Centre 43: 211.